

# FERMENTASYON MİKROBİYOLOJİSİ

FERMENTASYONDA ROL OYNAYAN MİKROORGANİZMALAR

# PROPIYONİK ASİT BAKTERİLERİ

- *Propionibacteriaceae* familyasına dahil düzensiz şekilli, hareketsiz, sporsuz, gram pozitif, kokoid veya çubuk şeklinde bakterilerdir.
- Bu familya içinde sadece *Propionibacterium* cinsi gıdalarda önemlidir. Bu cins süt ürünlerinde özellikle peynirlerde önem taşır ve 11 türü mevcuttur. Katalaz pozitif ve oksijene toleranslı anaerobik bakterilerdir.
- *Propionibacterium* cinsi bakteriler karbonhidratlardan yüksek oranda propiyonik asit, asetik asit ve CO<sub>2</sub>, daha az oranda ise izovalerik, süksinik, formik ve laktik asit üretirler.



*P.freudenreichii ssp.shermanii*

# PROPIYONİK ASİT BAKTERİLERİ

- Optimum gelişme sıcaklıkları 30°C ve optimum gelişme pH'ları ise 6,0-7,0 arasındadır. Propiyonik asit bakterilerinin çoğu laktik asidi fermente ederek propiyonik asit, asetik asit ve CO<sub>2</sub> üretirler.
- İsviçre tipi peynirlerde (Emmental ve Gruyere) *P.freudenreichii* ssp.*shermanii* laktik asidi fermente ederek gaz üretir, peynirde gözenek oluşturur ve lezzeti olumlu yönde etkiler.
- Bazı türleri gri, pembe, kırmızı, sarı ve turuncu pigment oluşturur. Pigment üreten türler peynirde istenmeyen renk oluşumuna neden olur.

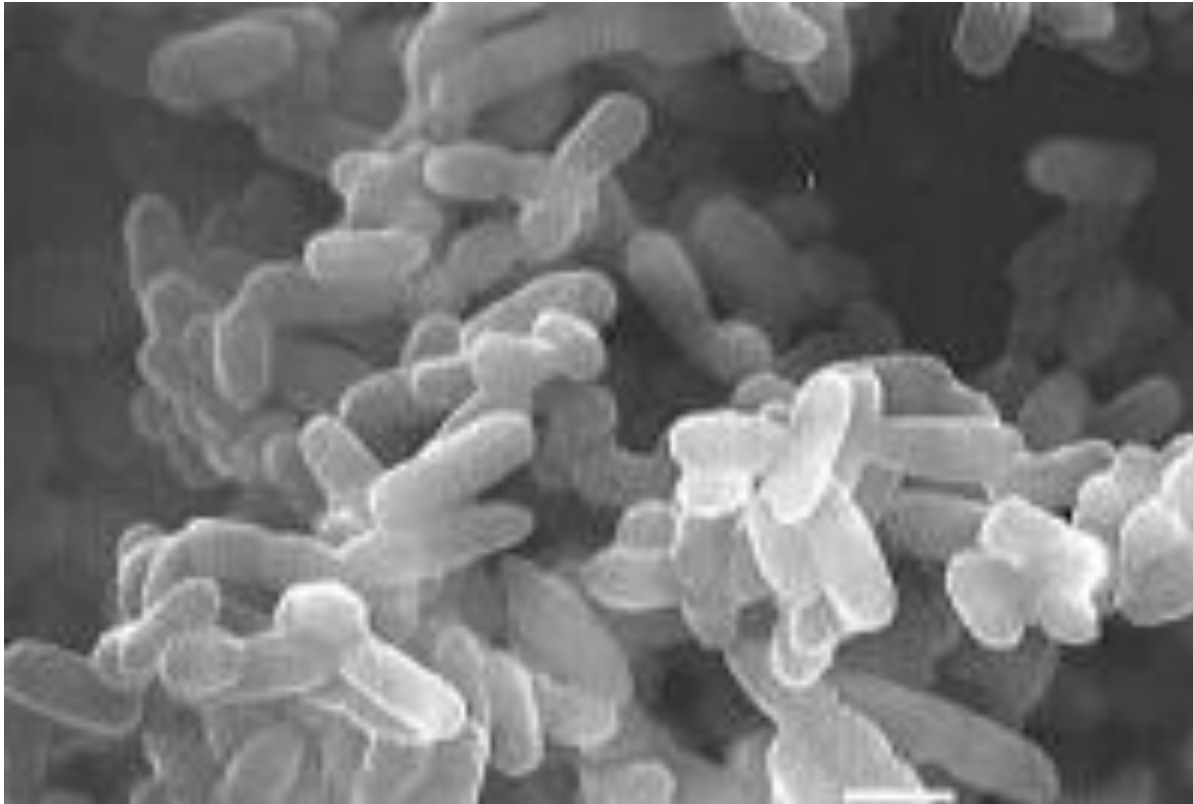


# ASETİK ASİT BAKTERİLERİ

- Asetik asit bakterileri *Pseudomonadaceae* familyasına dahil, gram negatif, katalaz pozitif, hareketli, mutlak aerobik, kavisli çubuk şeklinde bakterilerdir.
- *Acetobacter* ve *Gluconobacter* cinsi bakteriler çeşitli organik bileşikleri, organik asitlere okside ederler ve endüstriyel fermentasyonla sirke üretiminde kullanılırlar.

# ASETİK ASİT BAKTERİLERİ

- Tabiatta oldukça yaygın şekilde bulunurlar özellikle alkol fermentasyonunun gerçekleştiği bitkilerde daha yaygındırlar.
- Sirke bakterileri olarak bilinen *Acetobacter aceti* ve *A.xylinum* laktik asit bakterilerinin tam tersine aerobik ve oksidatif bakterilerdir.
- Bu bakteriler etil alkolü oksijenli ortamda asetik aside dönüştürürler.



*Acetobacter aceti*



# FERMENTASYONDA ROL OYNAYAN MAYALAR

- Mayalar fermentasyon teknolojisinde kullanılan mikroorganizmalar arasında önemli bir grubu oluştururlar. Alkol ve CO<sub>2</sub> üreten fermentatif mayalardan en önemlileri ekmek, bira ve şarap gibi ürünlerin üretiminde rol oynarlar.
- Mayaların bir kısmı mutlak aerobik mikroorganizmalar olup bu mayalar film mayaları veya oksidatif mayalar olarak tanımlanır.
- *Ascomycetes* sınıfına dahil spor oluşturan mayalar endüstriyel öneme sahip pek çok maya cinsini içine alırlar. Bu cinslerden biri de *Saccharomyces*'dir.

# FERMENTASYONDA ROL OYNAYAN MAYALAR

- Ekmek, bira ve şarap üretiminde kullanılan mayalar *Saccharomyces* cinsine ait türlerdir (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *ellipsoides*).
- Kımız ve kefir kültüründe *Candida pseudotropicalis* (*C.kefyr* veya *Torula kefyr*), *Kluyveromyces marxianus*, *Torula koumiss* ve *Saccharomyces lactis* gibi laktozu fermente eden mayalar bulunmaktadır.



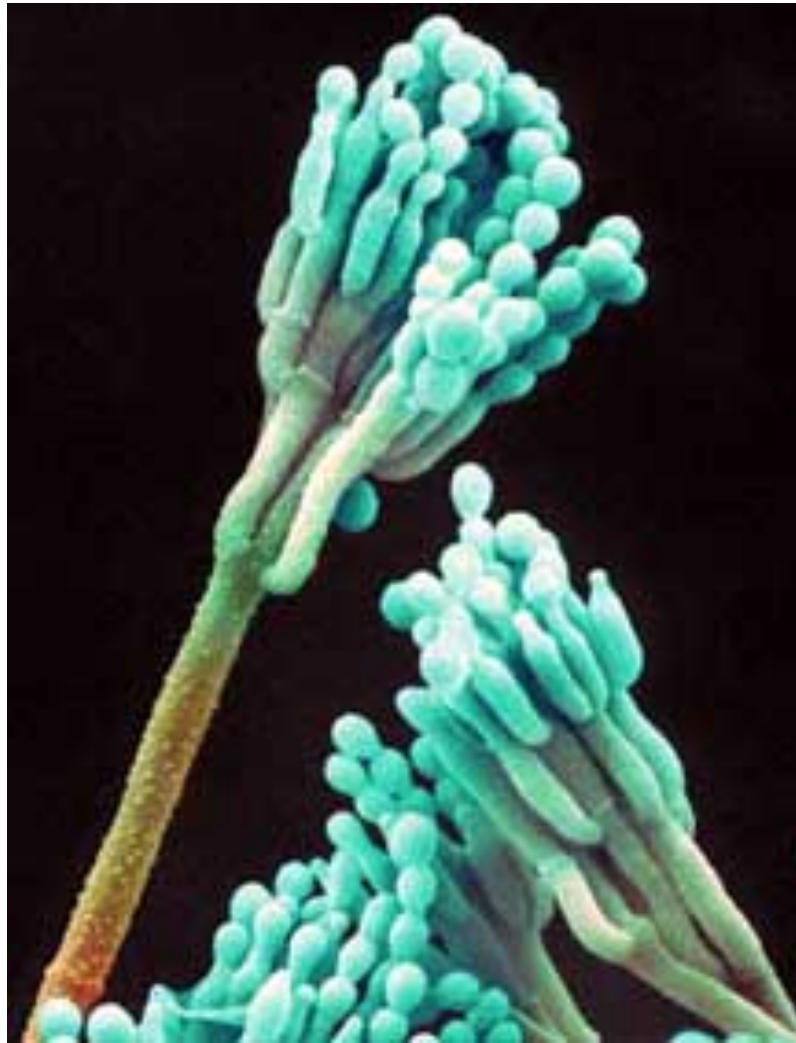
*Saccharomyces cerevisiae*

# FERMENTASYONDA ROL OYNAYAN KÜFLER

- Rokfor (Roquefort), Kamamber (Camembert) gibi peynirlerin ve soya sosu, tempe gibi gıdaların üretiminde bazı küfler rol oynamaktadır.
- Gıda sanayiinde fermente gıdaların üretiminde rol oynayan iki önemli cins (*Aspergillus* ve *Penicillium*) vardır. Bu cinsler dışında *Rhizopus* gibi bazı küf cinsleri de çeşitli gıdaların üretiminde kullanılmaktadır.

# FERMENTASYONDA ROL OYNAYAN KÜFLER

- Özellikle fermente peynir çeşitlerinin üretiminde *Penicillium camemberti*, *P.roqueforti*, *P.gorgonzolae*, *P.slilton*, *Mucor rasmussen*, *Aspergillus oryzae*, *Geotrichum candidum* gibi küf türleri kullanılmaktadır.
- Bunların dışında tempe, soya sosu, miso, gari v.b. gibi Uzakdoğu ülkelerine özgü bitkisel fermente gıdaların üretiminde yukarıda sözü edilen küf türlerinden bazılarının yanında *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* gibi küfler de kullanılmaktadır.



*Penicillium roqueforti*



# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Fermente ürünlerin üretiminde kullanılan mikroorganizmalar hammaddeye saf ya da karışık kültür olarak ilave edilir.
- Fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmaların tabii olarak hammaddede yeterli düzeyde bulunduğu gıdalarda fermentasyon starter kültür ilave edilmeden spontan fermentasyonla gerçekleştirilir.



# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Fermentasyon işleminin sağlıklı bir şekilde gerçekleşebilmesi, dolayısıyla arzu edilen kalitede bir fermente ürünün üretilebilmesi kullanılan starter kültürlerin saflığına, aktivitesine ve hammaddede antibiyotik veya bakteriyofaj gibi inhibitörler bulunmamasına bağlıdır.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Fermente gıdaların üretiminde kullanılan kültürler;
  - Hammadede arzu edilen değişimlere neden olabilen, herhangi bir kontaminant ihtiva etmeyen stabil kültürler olmalıdır.
  - Starter kültürlerin tazelenmesi ve canlılığının sürdürülebilmesi amacıyla belli periyotlarla yeni besi yerine yapılan pasajlar veya transferler kültürün özelliklerinde arzu edilmeyen bazı değişikliklere neden olabilmektedir.
  - Fermente ürünlerin üretiminde kullanılabilecek özelliklere sahip bir kültürün stoklama periyodu boyunca söz konusu karakteristiklerinden herhangi birini kaybetmeksizin saf ve aktif bir şekilde korunması ve saklanması gerekmektedir.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Bu amaçla kültür, stok kültürden uygun bir besi ortamına ekim yapılarak maksimum gelişme fazına ulaşıncaya kadar inkübe edildikten sonra gelişmenin önlenebileceği düşük sıcaklıklarda muhafaza edilir.
- Starter kültürlerin direkt üretimde kullanılabilecek şeklinin hazırlanabilmesi için öncelikle stok kültürden kültürler hazırlanır:

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- **Ana kültür:** Ticari kültürlerden küçük hacimlerde günlük hazırlanan ve işletmede kullanılacak starterin kaynağını oluşturacak kültürlerdir.
- Ana kültürden **ara kültür:** Ana kültürden süte aşılacak bulk starteri oluşturmak üzere kademeli olarak giderek artan hacimlerde üretilen kültürlerdir.
- Ara kültürden de **bulk kültür:** Ara kültür hazırlama basamaklarının en son aşamasında elde edilen ve işletmede mamule işlenecek hammaddeye (ör. süte) aşılacak üzere hammadde miktarına bağlı olarak belirli miktarda hazırlanan kültürlerdir.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Sağlıklı şartlarda üretilen aktif starter kültürlerin hammaddeden ve çevreden kaynaklanabilecek bazı inhibitörler tarafından inhibisyonu da fermente süt ürünlerinin üretiminde büyük problemlere neden olabilmektedir. Bunlar;
  - Doğal inhibitörler
  - Antibiyotikler
  - Bakteriyofajlar
  - Deterjan ve dezenfektan kalıntıları
  - Lökositler,
  - insektisitler gibi çevre kaynaklı bazı inhibitörler,
  - uçucu ve uçucu olmayan bazı bileşikler (yağ asitleri, formik asit, formaldehit, asetonitril, kloroform, eter).

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Ticari starterlerin stok kültürleri üç şekilde üretilmektedir:

## 1. Sıvı kültürler

## 2. Kurutulmuş kültürler:

- a. Püskürtmeli kurutucuda kurutulmuş konsantre olmayan kültürler
- b. Dondurarak kurutulmuş (liyofilize edilmiş) konsantre olmayan kültürler
- c. Dondurarak kurutulmuş konsantre kültürler

## 3. Dondurulmuş kültürler

- a.  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuş konsantre olmayan kültürler
- b.  $-40$  ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuş konsantre kültürler
- c.  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azotla dondurulmuş konsantre kültürler

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- **SIVI KÜLTÜRLER**
- Sıvı kültürler, kısa mesafelerde veya 1 gün gibi kısa sürede işletmeye ulaşma imkanının bulunduğu durumlarda pratik ve ekonomik olması nedeniyle uygulama alanı bulmuş olan ve bu durumdaki işletmelerde yaygın şekilde kullanılan starter kültür çeşididir.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- **SIVI KÜLTÜRLER**
- Sıvı kültürler işletmede uygun bir besi yerine transfer edildikten sonra inkübasyona tabi tutularak sıvı formda, buzdolabında depolanırlar.
- İşletmede birkaç gün gibi kısa bir süre saklanabilen sıvı kültürler süte ilave edilmeden önce birkaç kez aşılansarak aktif hale getirilmelidir.



# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Peynir üretiminde kullanılan sıvı kültürlerin stoklanmasında iki değişik yöntem uygulanmaktadır:
  - 1. 0,1 mililitre aktif taze kültür sterilize edilmiş ve soğutulmuş 10 mililitre (genellikle yağsız) süte inoküle edilir ve 4°C'de stoklanır.
  - 2. Kültür gözle görülür bir pıhtı oluşuncaya kadar inkübe edilir ve 4°C'de depolanır.
- Sıvı kültürler starter kültür üretim noktalarına yakın işletmeler için ekonomik olmalarına karşın bakteriyofaj bulaşma ihtimali fazla kültürlerdir. Bu tip kültürlerin diğer bir dezavantajı ise karışık kültürlerde bakteriler arası oranın çabuk bozulmasıdır.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- **KURUTULMUŞ KÜLTÜRLER**
- Kurutulmuş kültürler
  - püskürtmeli kurutucuda kurutulmuş kültürler ve
  - dondurarak kurutulmuş kültürler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.
- Bu kültürlerden dondurarak kurutulmuş kültürlerin konsantre formları da üretilmektedir. Kurutulmuş kültürlerde canlı mikroorganizma oranı %1-2 civarındadır.
- Bu nedenle fermente ürünlerin üretiminde kurutulmuş starter kültürlerin kullanımı durumunda kültürün maksimum aktiviteye ulaştırılabilmesi için taze besi yerine birkaç kez transfer yapılması gerekmektedir.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Püskürtmeli kurutucuda kurutulmuş kültürlerle kıyaslandığında dondurularak kurutulmuş kültürler her açıdan daha sağlıklı sonuçlar vermektedir.
- Dondurarak kurutulmuş kültürlerde canlı mikroorganizma oranı püskürtülerek kurutulmuş kültürlerle kıyasla daha yüksektir.
- Ticari olarak üretilen ilk dondurarak kurutulmuş kültürler genellikle çoğaltma ve aktiveleştirme işlemleri uygulanmadan direkt olarak hammaddeye inoküle edilemeyen kültürlerdi. Daha sonraları direkt olarak üretimde kullanılabilecek aktivitede dondurarak kurutulmuş kültürler üretilmiştir.
- Dondurma ve kurutma gibi işlemler bakterilerin hücre membranına zarar verebilmektedir.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Starter kültürlerle uygulanacak dondurma ve kurutma gibi işlemlerden önce ortama kültürün hücre membranında meydana gelebilecek muhtemel herhangi bir zararı minimuma indirmek amacıyla **kriyojenik** maddeler veya bileşikler ilave edilmelidir.
- Askorbik asit, monosodyum glutamat ve aspartam gibi katkı maddelerini, inositol, sorbitol, mannitol, glukoz, sakkaroz, mısır şurubu, maltoz, monosakkaritler veya disakkaritler gibi kriyojenik maddeleri ihtiva eden ve pH'sı 6,0-6,5 olan sütlü bir besi yeri kullanılmaktadır.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Kurutma ve dondurma işlemine karşı mikroorganizmaların canlı kalma oranını ve canlı mikroorganizma sayısını etkileyen pek çok faktör söz konusudur. Süt sanayiinde kullanılan dondurarak kurutulmuş starter kültürlerin canlılık oranını etkileyen faktörler:
  1. **Mikroorganizmanın tipi, cinsi ve türü:** Laktik asit bakterileri dondurarak kurutma yöntemiyle saklanabilmektedir. Ancak *L.bulgaricus* ve *L.helveticus* dondurarak kurutma işlemine karşı hassas mikroorganizmalardır.
  2. **Mikroorganizmanın gelişme fazı:** *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* mikrobiyal gelişme fazı dikkate alındığında durgunluk döneminin başında (stationary phase), bu iki tür dışındaki diğer starter kültürler ise logaritmik çoğalma dönemlerinin (exponential phase) son aşamasında dondurma ve kurutma gibi işlemlere karşı daha dayanıklıdırlar.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

3. **Besiyeri ve ortamdaki besin maddeleri:** Dondurma ve kurutma gibi işlemler öncesinde mikroorganizmanın geliştirildiği besiyeri mikroorganizmanın bu işlemlere karşı dayanıklılığı açısından önem taşımakta ve mikroorganizma cinsine göre bu besiyerinin kompozisyonu değişmektedir.
- *Streptococcus thermophilus* için Na-malat ilave edilmiş yağsız sütün, *Lactobacillus bulgaricus* için laktoz ve arginin hidroklorür solüsyonunun, *Leuconostoc* spp. için ise glutamik asitin koruyucu bir etkisi olduğu bildirilmektedir.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Buna ilaveten kültür süspansiyonunun hazırlanacağı ortamda adonitol ve gliserolün varlığı pek çok laktik asit bakterisini dondurarak kurutma işlemine karşı korumaktadır.
- Dondurarak kurutma işleminden sonra kültürün aktive edilmesi amacıyla kullanılan besi yeri ve bu besi yerinin kompozisyonu da ayrıca canlı mikroorganizma oranının maksimum düzeyde tutulabilmesi açısından önem taşımaktadır.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Buna ilaveten kültür süspansiyonunun hazırlanacağı ortamda adonitol ve gliserolün varlığı pek çok laktik asit bakterisini dondurarak kurutma işlemine karşı korumaktadır.
- Dondurarak kurutma işleminden sonra kültürün aktive edilmesi amacıyla kullanılan besi yeri ve bu besi yerinin kompozisyonu da ayrıca canlı mikroorganizma oranının maksimum düzeyde tutulabilmesi açısından önem taşımaktadır.



# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Bu tip besi yerlerine ilave edilen bazı besin ögeleri gerek besi yerini zenginleştirici, gerekse mikroorganizmaları koruyucu özellikleriyle kurutulmuş kültürdeki canlı mikroorganizma oranını maksimum düzeyde tutabilmektedir.
- 4. **Ortamin pH'sı:** Besi ortamının pH'sının 5,0-6,0 arasında olması kültürdeki canlı mikroorganizma oranının maksimum düzeyde olmasını sağlamaktadır.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

5. **Nem:** Kurutulmuş kültürlerde nem oranı %3'den az olmalıdır.
6. **Dondurma, kurutma ve depolama sıcaklığı:** -20 ve -30°C'de dondurulan, -10 ve -30°C'ler arasındaki sıcaklıklarda kurutulan kültürler dondurarak kurutulmuş kültürler arasında maksimum bakteriyel aktivite gösteren kültürlerdir.
  - Kurutulmuş kültürlerin uzun süre stoklanması durumunda ise 5-10°C arasındaki sıcaklıklarda depolama, oda sıcaklığında depolamaya kıyasla kültürdeki canlı mikroorganizma sayısının yüksek olmasına neden olmaktadır.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- 7. Kültürü aktiveleştirme sıcaklığı:** Dondurarak kurutulmuş laktik starter kültürlerin canlılık oranı ve canlı kalma süreleri üzerinde aktiveleştirme sıcaklığının çok önemli bir etkisi vardır.
- Aktiveleştirme sıcaklığı kültüre uygulanan dondurma ve kurutma gibi işlemlerden zarar görmüş hücrelerin hücresel ribonükleotidlerinin sızıntısında etkili olmaktadır.
  - Mezofilik ve termofilik laktik asit bakterilerinin dondurarak kurutulmuş kültürleri için optimum aktiveleştirme sıcaklığının 20°C olduğu ortaya konmuştur.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- **DONDURULMUŞ STARTER KÜLTÜRLER**
- Dondurulmuş kültürler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuş,  $-40^{\circ}\text{C}$  ile  $-80^{\circ}\text{C}$  arasındaki sıcaklıklarda dondurulmuş ve  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azotta dondurulmuş kültürler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.
- Pratikte bu tip kültürlerin hazırlanmasında 10 ml steril litmuslu süt (pH 6,6)  $4^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra üzerine 1 ml aktif kültür ilave edilmekte ve tüpün ağzı iyice kapatılmaktadır.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Bu şekilde hazırlanan starter kültürler derin dondurucuda ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) en az bir sene saklanabilmekte, kullanılacağı zaman ılık su banyosunda çözöldükten sonra  $33^{\circ}\text{C}$ 'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmaktadır.
- Daha sonra steril yeni bir litmuslu süte %1 oranında aşılama yapılarak  $25^{\circ}\text{C}$ 'de 2-3 gün inkübe edilmektedir.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Bu şekilde soğuk süte aşılandıktan sonra dondurularak saklanan starter kültürler uzun süre aktivitelerini korurlar ve taze kültür gibi gelişebilme yeteneğini muhafaza ederler. Bu nedenle dondurulmuş kültürler yaklaşık 50 yıldan beri kullanılmaktadır.
- Dondurulmuş kültürlerde aktivite kaybının engellenebilmesi ve düşük sıcaklığın oluşturduğu olumsuz etkinin ortadan kaldırılabilmesi için bu kültürlerin hazırlandığı besiyeri ve ortamlara %10 yağsız süt, %5 sakkaroz, taze krema, %0,9 sodyum klorür veya %1 jelatin ilave edilerek canlı mikroorganizma sayısının azalması önlenir.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Ayrıca dondurulmuş konsantre kültürlerle (bu kültürlerin bir ml'sinde  $10^{11}$ - $10^{12}$  adet mikroorganizma mevcuttur) sodyum sitrat, gliserol, sodyum betagliserofosfat, maya ekstraktı, sakkaroz, krema, steril yağsız süt, pepton veya laktoz gibi **kriyojenik (veya kriyoprotektif)** maddelerin ilave edilmesi durumunda bazı mezofilik laktik asit bakterilerinin, bazı *Lactobacillus* türlerinin ve propiyonik asit bakterilerinin aktivitelerini daha iyi korudukları belirlenmiştir.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Dondurulmuş kültürlerin hazırlanmasında kullanılan besi yeri, ortamın çeşidi veya tipi, ortama ilave edilen nötralize edici maddeler ve/veya kriyoprotektif maddeler kültür aktivitesinin korunmasında en önemli rolü oynamaktadır.
- Bunlara ilaveten süt endüstrisinde kullanılan dondurulmuş starter kültürlerin aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisi de dondurulmuş *kültürün çözündürülme sıcaklığı ve süresidir.*
- Dondurulmuş kültürlerin çözündürülme işlemlerinin üretici firmaların tavsiyeleri doğrultusunda yapılması gerekmektedir.



# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Sıvı azotta  $-196^{\circ}\text{C}$  gibi çok düşük sıcaklıklarda dondurma işlemi kültür aktivitesinin korunması açısından en avantajlı yöntemdir.
- Sıvı azot yönteminde uygun bir besi ortamında geliştirilen starter kültürler logaritmik çoğalma döneminin sonunda özel separatörlerle ayrılarak sütün bir mililitresindeki mikroorganizma sayısı  $10^{11}$  olacak şekilde steril sütle karıştırılırlar.

# STARTER KÜLTÜRLERİN SEÇİMİ, HAZIRLANMASI VE STOKLANMASI

- Bu şekilde hazırlanan standart kültür önce glikolle 2°C'ye soğutulduktan sonra sıvı azot içerisindeki (-196°C) steril kutulara aseptik olarak doldurulur, kapakları kapatılarak aynı şartlarda stoklanırlar.
- Bu şekilde sıvı azotla dondurulmuş starterlerin fajlara karşı dayanıklı olmaları ve herhangi bir aşılamaya gerek olmadan doğrudan bulk starter olarak süte aşılabilme imkanı bulunmaktadır.
- Ancak yöntemin maliyetinin yüksek olması ve sıvı azotun temin edilme güçlüğü gibi dezavantajları da söz konusudur.